

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：15101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009 ～ 2011
 課題番号：21510068
 研究課題名（和文）アメリカワニを用いたハ虫類における内分泌かく乱物質の生殖影響に関する基礎的研
 究課題名（英文） Basic study on the effect of endocrine disruptors on reptiles reproduction using a model of American alligators, *Alligator Mississippiensis*
 研究代表者
 太田 康彦 (OHTA YASUHIKO)
 鳥取大学・農学部獣医学科・教授
 研究者番号：60069078

研究成果の概要（和文）：

温度依存性の性分化を示すアメリカンアリゲーターの温度感受性期間における生殖腺・生殖輸官系の組織形態アトラスを作成するとともに性ホルモン受容体の発現と局在を明らかにした。さらに温度感受性に関係する因子（主としてヒートショックタンパク質とミューラー管退縮ホルモン）を分子生物学的に同定して、ワニにおける性分化機構の一端を証明した。これらの結果は内分泌かく乱物質のハ虫類における生殖影響評価に貢献すると思われる。

研究成果の概要（英文）：

In American alligator showing temperature-dependent sex determination (TSD), development of reproductive organs, ontogeny of expression of estrogen and progesterone receptor and candidates involved in the TSD were identified during the thermo-sensitive period. These results may contribute to the understanding of endocrine disruptors on reptiles.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境ホルモン・ハ虫類・アメリカンアリゲーター・性分化・生殖輸管

1. 研究開始当初の背景

内分泌かく乱物質(EDs)の人類、野生生物に対する疑わしき影響は、多岐に及んでいると言われているが、関係が明確な現象はむしろ少ない。一方で食物連鎖による陸生動物への影響より、水棲動物への影響は直接的であるためより深刻で、ハ虫類への影響は因果関係が深いと考えられている。フロリダ半島のワニ(American alligator)が生活排水、工

場廃液、農薬などの複合汚染により、生息数が著しく減少したことは、当時フロリダ大学の在籍した Guillette 教授により報告されている(1994, 1996)。ワニの性分化は、染色体ではなく胚発生のある時期における温度により、雄は 33.5℃で生じる。しかし、この温度に感受性の高い時期にエストロゲンを投与すると雄化が抑制されることも分かっている。EDsの多くはエストロゲン様作用を示

すため、先の環境汚染がワニの生息数に影響を及ぼしたと推測されている。

2. 研究の目的

ワニの性分化における温度感受期（ステージ 19 から 25）の胚発生は詳細に研究されていない。温度感受性のメカニズムについても全く分かっていない。本研究はそれらを明らかにする目的で次の 7 課題の研究を実施した。

(1) アメリカンアリゲータ胚発生にともなう生殖腺および輸管系の分化における組織学的研究

温度依存的性決定と生殖腺・輸管系の分化との関連性を解明する目的で、発生組織図譜を作成し、EDs 影響に関する研究への基礎データとすることを目的としている。

(2) アメリカンアリゲータの性決定におけるヒートショックタンパク質の作用

胚時期の特定な時期（温度感受性期、TSP）に働く遺伝子発現のついてはほとんど知られていない。この研究では熱ストレスタンパク質として知られるヒートショックタンパク質とその関連タンパク質をコードする cDNA をクローニングして、TSP における遺伝子発現量検討した。

(3) ハ虫類エストロゲン受容体の単離・機能解析と染色体マッピング

ステロイドホルモンはその受容体を介して、ハ虫類を含む脊椎動物の生殖に重要な役割を担っている。ステロイドホルモン受容体はホルモン依存的な転写調節因子であるが、ハ虫類ではその遺伝子の特性等詳しい解析がほとんど行われていない。この研究では脊椎動物のエストロゲン受容体 (ER) の分子進化、およびハ虫類のエストロゲンが関与する内分泌システムの調べる目的で、ハ虫類から ER 遺伝子の単離を行った。

(4) アメリカンアリゲータからのミュラー管抑制因子 (AMH) 遺伝子の単離・同定

脊椎動物において、性決定の方法は種により大きく異なるが、アメリカンアリゲータは温度依存により性が決定される。ほ乳類におけるオスの初期性分化過程では、SRY、SOX-9、DMRT1 や SF-1 など様々な因子が働いており、ワニやカメでもそれらの性分化因子が働いている可能性が示唆されている。これらの因子のうち、ミュラー管抑制因子 (AMH) はミュラー管 (M 管) の退縮を引き起こす重要な性分化因子であるため、ワニの性決定機構を解析する一環として AMH 遺伝子のクローニングと発現機構の解析を行った。

(5) 雌性アメリカンアリゲータの発生における性ホルモン受容体発現について

エストロゲンやプロゲステロンなどの性ステロイドは受容体 (ER、PR) を介して下流遺伝子の発現を調節している。また、PR はエストロゲンの誘導タンパク質でもあるので内因性のエストロゲン分泌開始時期の見当に都合がよい。本研究は免疫組織学的手法を用いて主として胚時期での性ホルモン受容体の発現、局在を調べた。

(6) ワニにおける TGF β 関連シグナル因子の生殖腺での発現変動

ワニ生殖腺において、ステロイド系以外のシグナル経路に関する詳細な解析はほとんど行われていない。本研究では TGF β 関連遺伝子であるアクチビン、インヒビン、フォリスチン、さらに成長分化因子-9 (GDF-9) の生殖腺での遺伝子発現レベルの解析を行うとともに、胚発生過程における環境汚染の生殖腺への影響を考察した。

(7) アメリカンアリゲータ甲状腺の性ステロイドと甲状腺受容体の異なった発生時期における発現

甲状腺ホルモンは器官形成に多くの役割を持っている上、成体においても恒常性の維持や生殖機能に種々の役割を持つ。性ホルモン受容体が哺乳類甲状腺で発現しているため、エストロゲンシグナルと甲状腺機能の関連が推測されている。ワニ甲状腺も孵化後の成長と性ホルモン分泌の調節に関与し、性ホルモン受容体と個体成熟応じた発現の変化が予想される。本研究では個体成長に伴う甲状腺の性ホルモン受容体発現変化について追究した。

3. 研究の方法

本研究で使用したワニは全てフロリダ州政府の許可の下で、特に記載がない場合はウッドラフ湖より採集したものである。雌雄はそれぞれステージ (S) 20 からそれぞれ 33°C あるいは 33.5°C の孵卵器で飼育した (図 1)。孵化のステージは 26 である。

(1) アメリカンアリゲータ胚発生にともなう生殖腺および輸管系の分化における組織学的研究

採材は S14 から孵化時期の S26 までと、孵化後 1 ヶ月に行った。2 から 3 個体の各ステージ胚の下半身をブアン氏液で固定した。固定後は定法に従いパラフィン包埋を行った。10 μ m のヘマトキシリン-エオシン染色連続切片を作製して、生殖腺・副腎・中腎複合体複合体 (GAM) と生殖輸管系の組織検索を行った。

(2) アメリカンアリゲーターの性決定におけるヒートショックタンパク質の作用

雌雄を分化させる温度で飼育した卵から GAM を抽出した。孵化後 48 時間後と 1 カ月の個体からもどのように GAM を抽出した。ヒートショックタンパク質 (HSP) のクローニングは通常の方法で行い、各 HSP についてヒトを含む他の動物とのアミノ酸配列の同一性を検討して相関図を作った。さらに各ステージから抽出した mRNA を用いて cDNA を作成後、各 HSP mRNA 発現を RT-PCR で定量した。

(3) ハ虫類エストロゲン受容体の単離・機能解析と染色体マッピング

オキナワハブ、シマヘビ、アメリカワニ、フロリダアカハラガメの 4 種類のハ虫類を使用した。抽出した動物の肝臓と生殖腺から RNA を精製し、逆転写反応後に cDNA を得た。プライマーを使って cDNA を鋳型とする PCR 反応を行い、ハ虫類の ER の配列を決定した。さらに、単離したエストロゲン受容体がどの染色体に位置するのかを FISH 法で解析した。

(4) アメリカンアリゲーターからのミュラー管抑制ホルモン (AMH) 遺伝子の単離・同定

雌雄を分化させる温度で飼育した胚から GAM を採材した。また、孵化直後の個体も使用した。RNA を抽出し、ゲノム DNA は DNA ウォーキングによるゲノム上の AMH 遺伝子の解析に、RNA は RACE 法による AMH 遺伝子 cDNA の単離及び、胚発生時期などの AMH 遺伝子や性分化関連因子遺伝子の定量的 RT-PCR 法による発現解析に用いた。

(5) 雌性アメリカンアリゲーターの発生における性ホルモン受容体発現について

雌雄を分化させる温度で飼育した胚から生殖腺-副腎-中腎複合体を採材し、緩衝ホルマリンで固定した。ポジティブコントロールとして成体雌ワニの卵管を使用した。免疫染色に使用する抗体は、ウェスタンブロット法により交差性を確認し、通常の ABC 法により交差部位を可視化した。

(6) ワニにおける TGF β 関連シグナル因子の生殖腺での発現変動

雌雄を分化させる温度で飼育した胚を使用した。RNA の抽出後、cDNA を合成し、リアルタイム PCR により TGF β 関連シグナル因子の遺伝子発現レベルを調べた。

(7) アメリカンアリゲーター甲状腺の性ステロイドと甲状腺受容体の異なった発生時期における発現

雌雄を分化させる温度で孵化した個体の甲状腺をさまざまな時期に抽出し、ER 免疫染色を行った。遺伝子発現は、RNA を抽出した

後、通常の方法で cDNA を作製してリアルタイム PCR 法で定量した。

4. 研究成果

(1) アメリカンアリゲーター胚発生にともなう生殖腺および輸管系分化における組織学的研究

S14 胚においては生殖腺の分化は認められず、ウオルフ管 (W 管) のみ存在していた。S20 で W 管と M 管が全長に渡って形成されていた。S20 以降雌の温度 30°C を維持した個体では、生殖輸管系に関しては孵化時期である S26 まで管が太くなること以外に大きな変化がなかったが、S20 以降雄の温度 33.5°C で維持した個体においても、生殖輸管系は S26 で雌と大差が認められなかった。しかし、W 管の上皮を取り巻く筋層の形成が認められた。孵化後 1 ヶ月の雌個体では M 管と W 管が存在していた。一方、雄個体では M 管が退化しており、W 管のみが存在していた。孵化後 1 ヶ月で生殖輸管系の初期の分化が終了したと判断できる。

以上の結果から、生殖腺の分化が終了する S25 以降も M 管は退化せず、中腎が消失するまで残存することが分かった。我々の研究では、雄の温度で管理した S25 の個体では、M 管抑制ホルモンの mRNA が最大となっていたが (Urushitani et al., 2011)、精巢の分化である S26 においても M 管は存続した。M 管の退化には、AMH の継続的分泌が必要と考えられる。勝博士はアンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であるアロマターゼ発現 S24 に増大することを見出しており (未発表)、今回の組織学的検索における卵巣の分化時期と非常に良く合致する。今回作成した生殖器官における組織発生図譜は、今後の内分泌かく乱の研究に極めて有効に活用できると思われる。

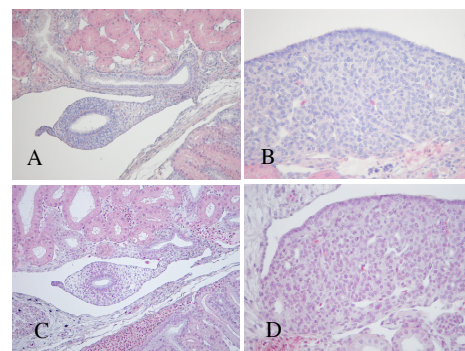


図 1. ステージ 25 における輸管系と生殖腺 (A-B: 雄、B-C: 雌)

(2) アメリカンアリゲーターの性決定におけるヒートショックタンパク質の作用

クローニングした 14 種の HSP 関連タンパク質はブラスト後、5'-RAC 法により全長の配列が決定し、配列の類似性を明らかにした。

中でも HSP40 と 60 は、比較した全ての動物種で 90%以上の相同性を示した。さらに CIRBP はヒトと 91%の相同性であり、イヌのもつ 3 種の CIRBP のイソ型の内、2 種と高い相同性を示した。HSP90 α と HSP90 β の動物種相同性は表 2 に示した。ワニ HSP90 α と HSP90 β は互いに類似性があり、さらにこれらの HSPs は他の動物と高い相同性を示した。

我々はワニの温度依存性性分化は HSP 遺伝子発現によると仮定した。この仮説に一部は HSPs がステロイドホルモンシャペロンとしても働くことを示している。そのため HSP 関連タンパク質の各ステージにおける遺伝子発現調べ、全ての HSP 関連タンパク質は孵化後の雌雄を含み、TSP の前後で発現することを示した(図 1)。生殖腺 HSP27(雄>雌)、生殖腺 HSP70(雄<雌)、副腎 HSP90 α (雄>雌)の性による二相性が認められた。これらの結果は TDS に対して新しい見解を与え、HSPs の生殖腺発達に対する役割の問題点を提起した。

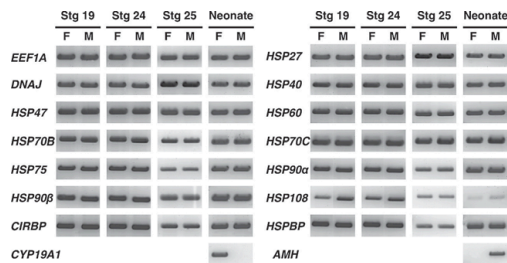


図 1. 温度感受生期における遺伝子発現

(3) ハ虫類エストロゲン受容体の単離・機能解析と染色体マッピング

今回、PCR法を用いて2種類のヘビから α 型と β 型のER遺伝子の単離に成功した。ワニとカメからER β 遺伝子の単離を行った。アミノ酸配列をもとにした系統樹を作製したところ、ワニはその他のハ虫類よりも鳥類と非常に近いことが分かった。PCR法を用いて様々な組織での発現解析を行い、 α 型と β 型の全組織で発現を確認した。

ヘビのER遺伝子の染色体上の位置を調べたところ、 α 型は1番染色体の短腕、 β 型は1番染色体の長腕に位置することが分かった(図1)。なお、オキナワハブ、シマヘビともにそれぞれ同じ染色体に位置していた。

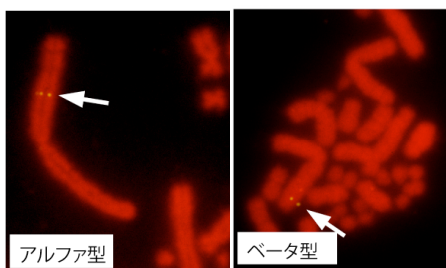


図1. ERの染色体マッピング

ハ虫類のERのホルモン依存性の解析は、生体内でのホルモンの役割、受容体の作用機構等の *in vivo* 解析のための重要な知見を提供し染色体マッピングの結果は、ハ虫類と鳥類の類似性を大きく示唆するものであり、染色体構造の分子進化の解明に役立つ結果と考えられる。

(4) アメリカンアリゲーターからのミューラー管抑制ホルモン (AMH) 遺伝子の単離・同定

我々はアメリカンアリゲーターの AMH 遺伝子の cDNA のクローニングならびにゲノム構造の解析を行った。アミノ酸配列の解析からこの AMH は、鳥類の AMH と最も高い相同性を持ち、また、ゲノム上の遺伝子構造もほ乳類及び鳥類とよく似ていることが明らかとなった(図 1)。これらの結果は、ワニ類の祖先と鳥類の祖先が中生代の初期に同じ槽歯類から分かれて進化したという報告と合うものである。この配列情報を基に、TSP における AMH ならびに性分化関連因子の発現解析を行った結果、AMH は有意に増加したものの、SOX9 や DMRT1 遺伝子は変化が見られなかった。これ AMH 遺伝子の発現と SOX9、DMRT1 遺伝子の発現に関連があると考えられたことや、ほ乳類や鳥類において AMH 遺伝子の発現調節にこれらの因子が性分化関連の転写因子が結合しうる可能性が示唆された。これらのことは、環境要因により性が決定する種においても、遺伝的に性が決定する種と共通の性分化機構が存在することを明らかにした。

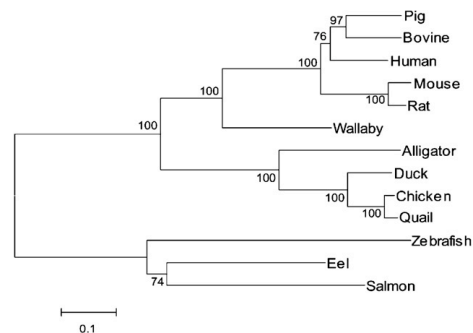


図 1. ワニ AMH とその他の動物への相同性

(5) 雌性アメリカンアリゲーターの発生における性ホルモン受容体発現について

ウエスタンブロット法により抗体のスクリーニングを行い、免疫染色では、抗体 Ab-10 と C-19 を使用した。成体ワニの卵管は、上皮細胞、間質細胞、筋細胞ともに ER α と PR を発現しており、核が明瞭に染色された。用いた ER α と PR 抗体が何れもワニ組織で交差することを示している。ステージ 20 以降は M 管と W 管のいずれも存在し、未分化の生殖腺の卵巣への分化はステージ 24 から生じた。ステージ 20 の M 管でも卵巣においては ER α および PR ともに発現していなかった。M 管における ER α の発現は上皮よりも間質の方が早

く、ステージ22では僅かに核が染まる細胞が存在した。その後間質細胞の染まりは明瞭となった。上皮細胞におけるER α 発現は非常に遅れて孵化時のステージ26まで発現しなかった。卵巣のER α 発現は卵巣への分化と同じ時期でステージ24となり、M管の間質細胞よりやや遅れた。W管におけPR発現はER α 発現より非常に遅く、間質細胞でステージ26となったが、上皮細胞の発現は観察できなかった(図1)。卵巣でのPR発現は、ER α よりやや遅れてステージ25であり、M管より僅かに早い。孵化後1ヶ月令では、M管上皮細胞、間質細胞ともにER α を発現していた。一方、PR発現は上皮細胞に認められたが、間質細胞の発現は弱くなった。

M管のER α 発現が卵巣の分化より早く起こることやPRの発現がエストロゲンで誘導されると考えるとM管および卵巣でのER α 発現は、内因性のエストロゲンに依存しないかも知れない。これに対して孵化後1ヶ月令における上皮細胞の発現は内因性エストロゲンによる可能性が示唆された。孵化後1ヶ月令においても筋層の分化は認められず、平滑筋細胞での発現は明らかでない。

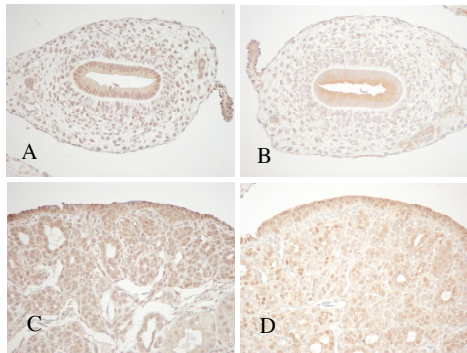


図1. ステージ26におけるM管と卵巣のERとPR発現(A-C:ER、B-D:PR)

(6) ワニにおけるTGFベータ関連シグナル因子の生殖腺での発現変動

持ち帰った受精卵の90%以上が孵化し、それは処理温度間、または採集した湖間での差は認められなかった。しかし、アポプカ湖から採集した卵から孵化した個体の66%が13ヶ月後まで生存できなかった。これはウッドラフ湖の卵の生存率(96%)と較べ有為に低下していた。ウッドラフ湖の個体を30°Cと33.5°Cで処理した際のオスとメスでの遺伝子発現レベルの比較を行った結果を図1に示した。卵巣では、フォリスタチン、GDF-9そして転写因子であるFox12の発現が精巣より高くなっていた。一方、インヒビンやFSH受容体の発現が卵巣より精巣で多くなっていた。

今回、我々はウッドラフ湖からのワニにおいて調べた遺伝子について性的二型性の存在することを示した。ワニではシグナル伝達系に働く様々な因子の機能は良く調べられてい

ないが、インヒビンやFSH受容体は卵巣よりも精巣で強く発現していることが分かった。これらの遺伝子産物は、高等脊椎動物では、セルトリ細胞数の調節など発生の性的分化の初期における役割が報告されている。ワニにおいても同様に性的発達に何らかの役割をなす事が今回の結果から推測される。対照的に、FSH、GDF-9は精巣よりも卵巣に多くの発現が認められた。いずれもステロイド生合成経路に関連する因子である。しかしながら、特にGDF-9のオスとメスでの生殖腺での発現変化はウッドラフ湖からの個体のみ認められアポプカ湖の由来の個体では認められなかった。アポプカ湖の個体では、フォリスタチンの発現レベルが低値であった。マウスではGDF-9の遺伝子破壊はフォリスタチンの現象を示し、多卵濾胞になる。アポプカ湖の個体は多卵濾胞を示すので、GDF-9の現象がその原因である可能性が高いと考えられる。

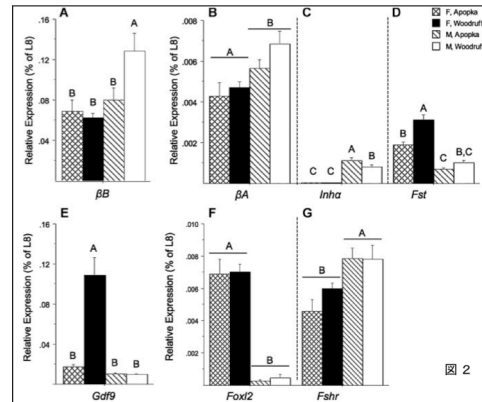


図2. 各湖沼におけるTGFベータ関連遺伝子発現

(7) アメリカンアリゲーター甲状腺の性ステロイドと甲状腺受容体の異なった発生時期における発現

各成長ステージの甲状腺中のER α は免疫染色により甲状腺濾胞細胞の核中に存在することが分かった。ER α のタンパク質発現は強く、全ての成長ステージで濾胞上皮細胞の多くに検出された。発現した細胞の比率(発現細胞/全ての細胞、%)は各成長ステージで統計学的な有意差が認められなかった。

リアルタイムPCR法により全ての成長ステージで甲状腺組織に性ホルモンならびに甲状腺ホルモン受容体遺伝子が発現していることが分かった。

以上の結果は、アメリカンアリゲーターの甲状腺で哺乳類同様にホルモン受容体(ER α 、AR)が発現していることを示しているが、ER α の性差を証明することが出来なかった。AR、TRについても同様に性差が認められなかった。しかし、甲状腺における性ホルモン受容体の存在は、性ホルモンによる甲状腺機能調節への関与と、これら性ホルモンに対するリ

ガンド機能を有する汚染物質の甲状腺発達ならびに機能へのかく乱の可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Moore, B.C., Milnes, M.R., Kohno, S., Katsu, Y., Iguchi, T., Woodruff, T.K., Guillette, L.Jr. Altered gonadal expression of TGF α superfamily signaling factors in environmental contaminant-exposed juvenile alligators. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 127:58-63, 2011. 査読あり
DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.01.004
- ② Bermudez, D., Skotko, J.P., Ohta, Y., Boggs, S.S.P., Iguchi, T., Guillette, L.J, Jr., Sex steroid and thyroid hormone receptor expressions in the thyroid of the American alligator (*Alligator mississippiensis*) during different life stages. J. Morphology, 271:698-703, 2011. 査読あり
DOI: 10.1002/jmor.10936
- ③ Urushitani, H., katsu, Y., Miyagawa, S., Kohno, S., Ohta, Y., Guillette, L. J. Jr., Iguchi, T. Molecular cloning pf anti-Mullerian hormone from the American alligator, *Alligator mississippiensi*. Mol. Cel. Endocrinol., 333:190-199, 2011. 査読あり
DOI: 10.1016/j.mce.2010.12.025
- ④ Katsu, Y., Matsubara, K., Kohno, S., Toriba, M., Oka, K., Guillette, L. J, Jr., Ohta, Y., Iguchi, T., Molecular cloning characterization, and chromosome mapping of reptilian estrogen receptors. Endocrinology, 151:5710-5720, 2010. 査読あり
DOI:10.1210/en.2010-0356
- ⑤ Kohno, S., Katsu, Y., Urushitani, U., Ohta, Y., Iguchi, T., Guillette, L. Jr. Potential Contributions of Heat Shock Proteins to Temperature-Dependent Sex Determination in the American Alligator. Sexual Devel., 4:73-87, 2010. 査読あり
DOI:10.1159/000260374

[学会発表] (計 3 件)

- ① 岡 香織・太田 康彦・井口 泰泉・勝 義直 アメリカンアリゲーターのコルチコイド受容体の単離と機能解析. 日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 11 日、旭川市大雪クリスタルホール (旭川市)

- ② Kohno, S. Katsu, Y. Ohta, Y. Iguchi, T., Guillette, L.J. Which estrogen receptor (ESR1; ER α or ER2; ER β) is involved in sex determination and gonadal differentiation? Michigan University, NASCE2011, 2011 年 7 月 14 日, Michigan league (Ann Arbor)
- ③ Ohta, Y., Urushidani, H., Takeuchi, T., Iguchi, T., Katsu, Y., Kohno, S., Brandon, M. and Guillette, L.J. A Preliminary Study on Immunohistochemical Detection of Estrogen Receptor in American Alligator Oviducts - Specificity of Antibodies. e.hormone, 2009 年 10 月 21 日, Tulene University (New Orleans)

[その他]

ホームページ等

<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/ohta>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 康彦 (OHTA YASUHIKO)
鳥取大学・農学部獣医学科・教授
研究者番号：60069087

(2) 研究分担者

勝 義直 (KATSU YOSHINAO)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：00332180

(3) 連携研究者

竹内 崇師 (TAKEUCHI TAKASHI)
鳥取大学・農学部獣医学科・准教授
研究者番号：10325061
井口 泰泉 (IGUCHI TAISEN)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授
研究者番号：90128588